

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental (*true experiment design*) dengan menggunakan metode *Post Test Randomized Group Design*.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Biomedik Universitas Muhammadiyah Malang selama 4 minggu.

4.3 Populasi dan Sampel

4.3.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*).

4.3.2. Sampel

Sampel yang digunakan yaitu tikus putih jantan (*Rattus norvegicus strain wistar*) berusia 2-3 bulan berat badan 250-300 gram, sebanyak 20 ekor tikus dengan 4 kelompok perlakuan dengan metode *simple random sampling*.

4.3.3 Besar Sampel

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sesuai dengan rumus berikut :

$$DF = N - k = kn - k = k(n-1)$$

Keterangan :

DF = *Degree Freedom*

N = total sampel

n = jumlah sampel tiap kelompok

k = jumlah kelompok

Rentang DF yang dapat diterima adalah 20 sebagai nilai maksimum dan 10 sebagai nilai minimum. Jumlah sampel tiap kelompok dapat diketahui melalui rumus :

$$n = DF/k + 1$$

$$\text{Minimum } n = 10/k + 1$$

$$= 10/4 + 1$$

$$= 3.5$$

$$\text{Minimum } N = \text{minimum } n \times k$$

$$= 3.5 \times 4$$

$$= 14$$

Rumus total sampel yaitu:

$$\text{Maksimum } n = 20/k + 1$$

$$= 20/4 + 1$$

$$= 6$$

Maksimum $N = \text{maksimum } n \times k$

$$= 6 \times 4$$

$$= 24$$

(Arifin & Zahiruddin, 2017)

Dari hasil perhitungan tersebut, diperoleh rentang total sampel yaitu 14-24 sampel. Total sampel dalam penelitian ini adalah 20 ekor tikus dalam 4 kelompok perlakuan, sehingga setiap kelompok diisi 5 ekor tikus putih jantan (*Rattus novergicus strain wistar*).

4.3.4 Teknik Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel pada penelitian ini adalah *Simple Random Sampling* yaitu pengambilan sampel tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain wistar yang sesuai dengan kriteria penelitian pada masing-masing kelompok perlakuan.

4.3.5 Karakteristik Sampel Penelitian

1. Kriteria Inklusi

- a. Tikus putih (*Rattus novergicus strain wistar*) dengan berat badan 200-300 gram
- b. Jenis kelamin jantan
- c. Umur berkisar 2-3 bulan

- d. Kondisi tubuh hewan coba sehat ditandai dengan gerakannya yang aktif, bulu yang tebal berwarna putih dan mata yang jernih

2. Kriteria Eksklusi

- a. Tikus yang sebelumnya sudah diinduksi dengan bahan lain atau yang pernah digunakan untuk penelitian yang lain.
- b. Tikus yang sakit (gerakan tidak aktif dan mata tidak jernih) selama penelitian

3. Kriteria *Drop Out*

Tikus yang mati selama penelitian

4.3.6 Variabel Penelitian

a. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis paparan inhalasi benzena (C_6H_6).

b. Variabel tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah nilai kadar kreatinin serum.

4.3.7 Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional	Indikator Variabel	Cara Ukur Variabel	Alat Ukur	Skala Ukur
Variabel Bebas						
1.	Benzena	Benzena (C ₆ H ₆) dalam penelitian ini didapatkan dari CV Asian Bahan Farmasi Semarang dalam bentuk cairan dengan volume 1 liter.	Dosis I : 1 ppm Dosis II: 10 ppm Dosis III: 100 ppm	Benzena (C ₆ H ₆) cair diuapkan dengan menggunakan plat panas kemudian kadarnya di monitor oleh gas sensor detector	Gas Sensor detector	Numerik
Variabel Tergantung						
2.	Kreatinin	Kreatinin merupakan suatu parameter untuk mengukur laju filtrasi glomerulus yang memiliki satuan mg/dl	Rata-rata kadar kreatinin serum (mg/dl)	Sampel darah diambil melalui intrakardial sebanyak 3cc dan dimasukkan kedalam tabung vacutaner untuk di analisis menggunakan alat	Biosystem A12	Numerik

4.4 Alat dan Bahan Penelitian

4.4.1 Alat

1. Timbangan untuk menimbang berat badan tikus

2. Alat pemeliharaan tikus :
 - Bak tikus
 - Penutup kandang dari anyaman kawat
 - Botol air
 - Sekam
3. Alat untuk memberikan perlakuan
 - Box ukuran 50 cm x 42 cm x 40 cm
 - Gas detektor
4. Alat pembedah tikus
 - Bedah minor
 - Papan bedah
 - Handscone
 - Diethyl eter
 - Jarum
 - Sduit 3 cc
5. Alat pengukur kadar kreatinin darah
 - Reagen kreatinin
 - *Microplate*
 - Fotometer
 - Stopwatch
 - Inkubator
 - Pipet mikro.
 - *Biosystem A12*

6. Alat lain yaitu kamera, kertas label, buku catatan, dan alat tulis.

4.4.2 Bahan

1. Bahan pemeliharaan tikus
 - Bahan pakan
 - Aquadest
2. Hewan percobaan
3. Benzena murni 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm

4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Proses adaptasi

Tikus diadaptasikan dalam kandang selama tujuh hari sebelum dipapar benzena per inhalasi agar tikus dapat menyesuaikan dengan lingkungan yang baru. Selama proses adaptasi tikus diberikan minum *ad libitum* dan pakan standar BR-1.

4.5.2 Pembagian kelompok tikus

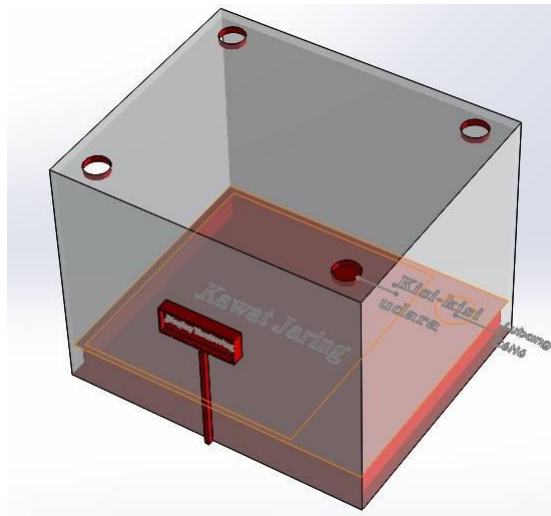
Jumlah tikus yang digunakan sebanyak 20 ekor dibagi menjadi 4 kelompok, sehingga setiap kelompok terdapat 5 ekor tikus:

1. Kontrol negatif (K-) : diberi minum dan pakan standar BR-1 sebanyak 20 gram/hari/tikus setiap hari selama 28 hari. Kontrol negatif hanya berfungsi sebagai pembanding nilai kreatinin serum pada tikus putih jantan (*Rattus novergicus Strain Wistar*).

2. Kelompok I (P1): diberi minum dan pakan standar BR-1 sebanyak 20 gram/hari/tikus setiap hari dan diberikan benzena murni dengan dosis 1 ppm setiap 8 jam/hari dan 5 hari/minggu selama 28 hari secara inhalasi.
3. Kelompok II (P2): diberi minum dan pakan standar BR-1 sebanyak 20 gram/hari/tikus setiap hari dan diberikan benzena murni dengan dosis 10 ppm setiap 8 jam/hari dan 5 hari/minggu selama 28 hari secara inhalasi.
4. Kelompok III (P3): diberi minum dan pakan standar BR-1 sebanyak 20 gram/hari/tikus setiap hari dan diberikan benzena murni dengan dosis 100 ppm setiap 8 jam/hari 5 hari/minggu selama 28 hari secara inhalasi.

4.5.3 Pemaparan inhalasi benzena

Benzena dituangkan ke dalam *hotplate* sebagai alat yang mentransformasi bentuk cair ke uap kemudian uap akan dideteksi oleh sensor gas benzena. Konsentrasi benzena akan dikontrol oleh modul arduino dan mikrokontroler sehingga kadar benzena dalam kotak akan stabil, konsentrasi tersebut dapat dilihat dari *display* yang dipasang di kotak.



Gambar 4.1
Desain alat pemapar benzena

4.5.4 Dasar Penentuan Dosis

Dosis benzena yang digunakan pada masing-masing kelompok perlakuan yaitu 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm selama 8 jam/hari, 5 hari/minggu selama 28 hari. Dasar 1 ppm adalah batas aman yang ditentukan oleh OSHA (*Occupational Safety and Health Administration's*) untuk paparan benzena jangka pendek. Sedangkan 100 ppm berdasarkan laporan kadar benzena di sebuah pabrik sepatu yang terletak di Cina (McHale, Luoping, & Martyn, 2012). Populasi umum dapat terpapar benzena di lingkungan hidupnya dan kadar paparannya lebih rendah dari kadar paparan di lingkungan industri, yaitu antara 1-10 ppm (Clional, 2012).

4.5.5 Proses anestesi dan pengambilan sampel darah

a. Proses anestesi

Kelompok tikus yang telah terpapar benzena secara inhalasi selama 28 hari maupun kelompok kontrol akan dilakukan proses

anastesi dengan memasukkan tikus kedalam toples kaca yang didalamnya berisi kapas yang sudah dicampur dengan diethyl eter dengan dosis $\pm 0,67$ selama ± 60 detik.

b. Proses pengambilan sampel darah

Hewan coba dianestesi terlebih dahulu menggunakan diethyl eter dengan baik. Hewan coba dipastikan dalam keadaan pingsan kemudian diletakkan pada meja lilin dengan jarum pentul. Jarum dimasukkan ke antara sisi kiri dari processus xiphoideus dan costae yang terakhir. Setelah masuk kulit tarik bagian *plugger* spuit lalu masukkan jarum secara perlahan ke dalam *cavum thorax* menuju jantung tikus dengan sudut antara 40-45 derajat. Saat darah sudah masuk stabilkan spuit kemudian tarik *plugger* pelan-pelan sampai mendapat darah kurang lebih 1 cc. Sampel kemudian disentrifus selama minimal 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm sampai sel darah terpisah dengan serum kemudian serum diambil untuk pemeriksaan kadar kreatinin.

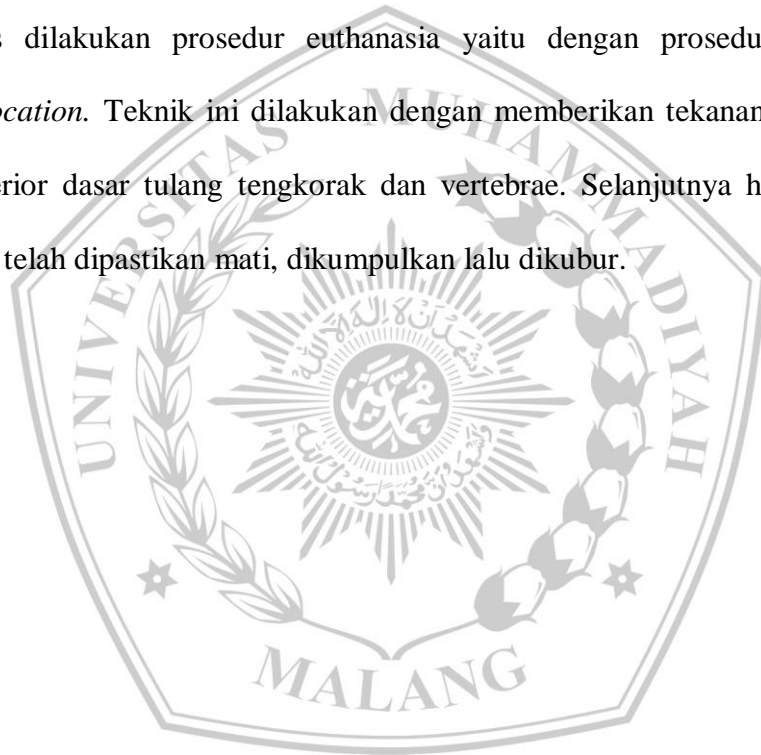
4.5.6 Pengukuran nilai kadar kreatinin serum

Alat dan bahan yang dibutuhkan yaitu darah utuh, tabung vacutaner kuning, sentrifuge, dan Biosystem A12. Darah tikus dihisap dari ventrikel kiri jantung menggunakan spuit 3 cc. Darah diletakkan di tabung vacutaner kemudian diletakkan pada alat sentrifuge. Sentrifugasi dilakukan selama minimal 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm dan suhu 4 derajat celcius.

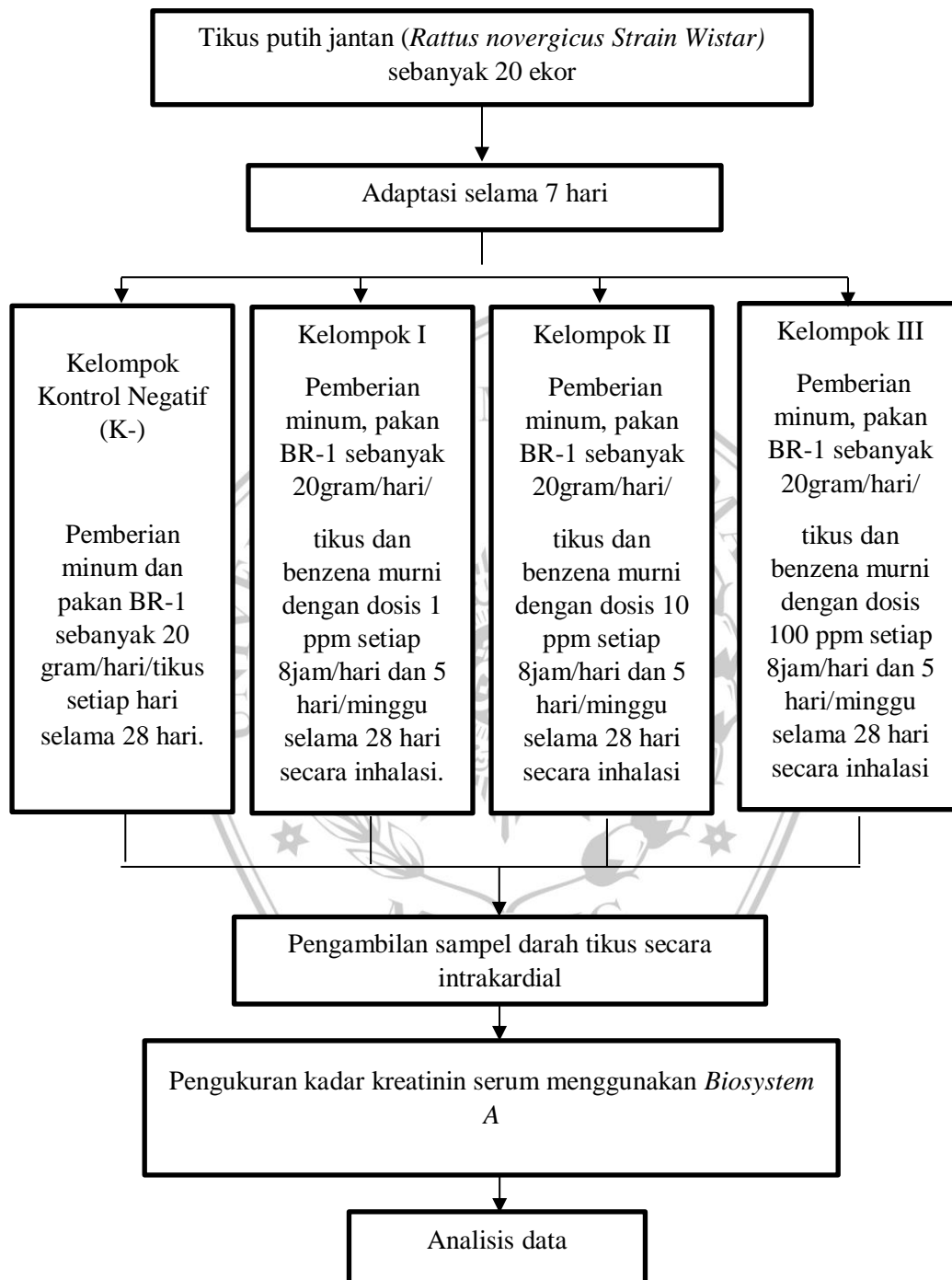
Setelah itu serum hasil sentrifugasi dibaca dengan menggunakan *Biosystem A12*.

4.5.7 Penanganan hewan coba setelah pengambilan sampel darah

Setelah membedah hewan coba, dipastikan bahwa hewan coba tidak mengalami *recovery*. Sebelum hewan coba dikubur, denyut nadi diperiksa dan dipastikan sudah berhenti. Jika hewan coba mengalami *recovery* maka harus dilakukan prosedur euthanasia yaitu dengan prosedur *Cervical Dislocation*. Teknik ini dilakukan dengan memberikan tekanan ke bagian posterior dasar tulang tengkorak dan vertebrae. Selanjutnya hewan coba yang telah dipastikan mati, dikumpulkan lalu dikubur.



4.6 Alur Penelitian



4.7 Analisis Data

- 1) Analisis *One way* ANOVA digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan antara kelompok perlakuan dengan kontrol secara bermakna. Hasil uji dikatakan bermakna jika nilai ($p < 0,05$).
- 2) Uji Post Hoc digunakan untuk mengetahui dosis paparan benzena pada kelompok perlakuan mana yang paling memberi pengaruh terhadap peningkatan kadar kreatinin serum pada masing-masing kelompok perlakuan.
- 3) Uji regresi linier digunakan untuk mengetahui seberapa besar pengaruh paparan inhalasi benzena terhadap peningkatan kadar kreatinin serum pada masing-masing kelompok perlakuan.

